

植物ペルオキシダーゼの病傷害に対する発現機構の解析

学位論文内容の要旨

病原体の感染や傷害は、植物を含む生物全般の生命を脅かすストレスの一種である。本研究は、過酸化水素を酸化剤とする酸化還元反応を触媒する酵素 class III 植物ペルオキシダーゼ (POX; EC 1.11.1.7) 遺伝子の病傷害に対する発現機構を明らかにし、植物の病傷害応答機構（病傷害シグナル伝達機構）のより深い理解をめざして行われた。

(1) 傷害誘導性タバコペルオキシダーゼ *tpoxN1* 遺伝子の器官および組織特異的発現

タバコ葉においてタバコモザイクウイルス感染ならびに傷害処理により発現が誘導される *POX* 遺伝子、*tpoxN1* 遺伝子の傷害後の器官特異的発現をタバコの葉、茎、葉柄および根を用いて調べた結果、茎で最も強い発現応答が見られた。*tpoxN1* 遺伝子の茎での傷害誘導発現は傷害後 1 時間から認められ、36 時間後を最大に少なくとも 54 時間後までその転写産物の蓄積が認められた。タバコの茎を用いた RNA ゲルブロット解析により、*tpoxN1* 遺伝子は既知の傷害シグナル物質および植物ホルモン処理等に対して応答を示さず、その発現誘導は新規の傷害シグナル伝達経路を介することが示唆された。また、種々の阻害剤を用いた発現解析から、*tpoxN1* 遺伝子の傷害誘導発現には、プロテインキナーゼ/プロテインフォスターゼ活性ならびに *de novo* タンパク質合成が必要であることが示された。約 2 kb の *tpoxN1* プロモーターを用いた *tpoxN1* プロモーター::*GUS* 形質転換タバコ植物の組織化学的解析により、RNA ゲルブロット解析の結果と同様、*tpoxN1* 遺伝子の茎における顕著な傷害応答が示され、また、傷害により主として傷害部位ならびに維管束組織特異的に発現誘導されることが示された。

(2) 傷害誘導性に関与する *tpoxN1* プロモーター領域の特定

tpoxN1 遺伝子が新規の傷害シグナル伝達系を介して発現誘導されることが示唆されたことから、*tpoxN1* 遺伝子の傷害応答に関与するプロモーター領域 (cis 領域) を限定する目的で、約 2 kb の *tpoxN1* プロモーターの削り込み解析を行った。種々の長さの *tpoxN1* プロモーター (np2~np7)::*GUS* 形質転換タバコ植物の傷害応答性を調べた結果、*tpoxN1* 遺伝子の傷害応答には np6~np7 領域 (-278~-115 bp) が重要であることが示された。np6~np7 領域をさらに削り込み (np6a, np6b および np6c)、タバコの茎を用いたボンバードメント法により解析したところ、np6a~np6b 領域 (-239~-201 bp) に *tpoxN1* 遺伝子の転写に関与する領域の存在が示唆された。また、np6~np7 領域をさらに 4 つに分割した領域 (np61~np64) をそれぞれ 4 回連続した配列 (np61~np64x4) を用い、np61~np64x4::*GUS* 形質転換タバコ植物を作成し傷害応答を調べた結果、顕著な傷害応答性は示されないもの

の、np6a～np6b 領域を含む np62 領域 (-239～-191 bp) に強い転写活性が認められた。np62 領域には既知の傷害に関与する cis 領域は認められず、この領域に *tpoxNI* 遺伝子の転写に関与する新規 cis 領域の存在が示唆された。

(3) *tpoxNI* 遺伝子発現に関与する転写因子の単離および解析

tpoxNI 遺伝子の転写誘導に関与する転写因子の単離を目的とし、タバコの茎に傷害を与えた 30 分ならびに 2 時間後の発現ライブラリーを作成し、np62x4 配列をプローブとした yeast ワンハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、DNA 結合ドメインとして知られる AP2 ドメインを持つタンパク質をコードする 2 種の新規 cDNA が単離された。これらのタンパク質を WRAF1 (wound-responsive AP2 like factor 1) および WRAF2 と命名した。WRAF1 ならびに WRAF2 の GST 融合タンパク質によるゲルシフト解析の結果、2 種の WRAF タンパク質は共に np62 領域に対する結合性を示し、*in vitro* での DNA 結合活性を有することが明らかとなった。np62 領域をさらに限定してゲルシフト解析を行ったところ、両タンパク質が結合する *tpoxNI* プロモーター上の cis 領域は、新規 cis 領域である AAGAAAATTTC 配列であることが示唆された。この配列は np5～np6 領域 (-546～-279) にも存在し、AAGAAAATTTC 配列を含む 47 bp の領域 (-434～-388) を用いてゲルシフト解析を行ったところ、WRAF1 ならびに WRAF2 は共にこの領域に対する結合活性を示した。WRAF1 および WRAF2 遺伝子の発現を RNA ゲルブロット解析により調べた結果、傷害後 1 時間を最大に一過的に誘導されており、その誘導は *tpoxNI* 遺伝子の発現誘導より迅速であった。タバコの茎を用いたボンバードメント法により WRAF1 ならびに WRAF2 タンパク質の *tpoxNI* 遺伝子の転写誘導活性を調べたところ、WRAF1 のみに転写誘導活性が認められた。これらの結果、*tpoxNI* 遺伝子の傷害誘導の少なくとも一部は、WRAF1 が *tpoxNI* プロモーター上の AAGAAAATTTC 配列に結合することで実行されると考えられた。

(4) イモチ病菌誘導性のイネ POX 遺伝子の発現解析

イネにおける POX 遺伝子の病傷害応答の解析を目的に、22 種のイネ POX 遺伝子を用いてイモチ病菌感染への応答を解析した。罹病性および抵抗性イネの第 8 葉期の葉を材料とし、イモチ病菌感染後の 22 POX 遺伝子の発現誘導を RNA ゲルブロット解析により調べた結果、10 種の POX 遺伝子で応答が認められた。これらの遺伝子は、罹病性イネでは感染 5 日後に特に強い発現応答が認められ、一方、抵抗性イネでは感染初期に罹病性より強い発現応答が認められる傾向が示された。また、イモチ病菌感染に対する発現応答パターンより 6 種類に分類された。22 種 POX 遺伝子のイモチ病菌感染に対する発現応答とイネ染色体上での局在性には関連が見られなかった。イモチ病菌感染により誘導されるイネ POX 遺伝子の器官特異的発現を RNA ゲルブロット解析により調べたところ、根、鞘葉、穂において、構成的な発現傾向が認められた。イモチ病菌感染応答性の 10 種 POX 遺伝子のプロベナゾール、ジャスモン酸ならびに傷害に対する応答を調べたところ、イモチ病菌感染により誘導される共通項を持ちながらも、それぞれの分子種は多岐にわたる応答性を示した。POX 遺伝子はイモチ病菌感染を含め、一つの刺激に対して複数の分子種が応答し、発現の重複性が示された。これらのことから、イネのイモチ病菌感染を含むストレス抵抗性に関して POX の重要性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 助 教 授 伊 藤 浩 之
副 査 講 師 曾 根 輝 雄

学 位 論 文 題 名

植物ペルオキシダーゼの病傷害に対する発現機構の解析

本論文は、図 49 枚、表 7 枚、引用文献 163 を含み、6 章からなる総ページ 163 の和文論文である。別に参考論文 5 編が添えられている。

病原体の感染や傷害は、植物を含む生物全般の生命を脅かすストレスの一種である。本研究は、酸化還元反応を触媒する酵素 class III 植物ペルオキシダーゼ (POX; EC 1.11.1.7) 遺伝子の病傷害に対する発現機構を明らかにし、植物の病傷害応答機構（病傷害シグナル伝達機構）のより深い理解をめざして行われた。

(1) 傷害誘導性タバコペルオキシダーゼ *tpoxN1* 遺伝子の器官および組織特異的発現

タバコ葉にてタバコモザイクウイルス感染ならびに傷害処理により発現が誘導される *POX* 遺伝子、*tpoxN1* 遺伝子の傷害後の器官特異的発現を調べた結果、茎で最も強い発現応答が見られた。*tpoxN1* 遺伝子の転写産物の蓄積は、茎において傷害後 1 時間から少なくとも 54 時間後まで認められた。*tpoxN1* 遺伝子は、既知の防御シグナル物質および植物ホルモン処理等に対して応答を示さず、その応答は新規の傷害シグナル伝達経路を介することが示唆された。また、種々の阻害剤を用いた発現解析から、*tpoxN1* 遺伝子の傷害応答には、プロテインキナーゼ/プロテインフォスターゼ活性ならびに *de novo* タンパク質合成が必要であることが示された。約 2 kb の *tpoxN1* プロモーターを用いた *tpoxN1* プロモーター::*GUS* 形質転換体の組織化学的解析により、*tpoxN1* 遺伝子の応答と同様、茎における顕著な傷害応答が示され、また、傷害により主として傷害部位ならびに維管束組織特異的に発現誘導されることが示された。

(2) 傷害誘導性に関与する *tpoxN1* プロモーター領域の特定

tpoxN1 遺伝子の傷害応答に関与するプロモーター領域を特定する目的で、約 2 kb の *tpoxN1* プロモーターの削り込み解析を行った。種々の長さの *tpoxN1* プロモーター (np2 ~ np7)::*GUS* 形質転換体の傷害応答性を調べた結果、np6 ~ np7 領域 (-278 ~ -115 bp) が重要であることが示された。この領域をさらに削り込み (np6a, np6b および np6c)、タバコの茎を用いたボンバードメント法により解析したところ、np6a ~ np6b 領域 (-239 ~ -201 bp) に *tpoxN1* 遺伝子の転写に関与する領域の存在が示唆された。また、np6 ~ np7 領域を 4 分

割した領域 (np61～np64) をそれぞれ 4 回連続した配列 (np61～np64x4) を用い、np61～np64x4::GUS 形質転換体を作成しプロモーター活性を調べた結果、np6a～np6b 領域を含む np62 領域 (-239～-191 bp) に強い転写活性が認められた。np62 領域には既知のストレス応答に関与する cis 領域は認められず、この領域に *tpoxN1* 遺伝子の転写に関与する新規 cis 領域の存在が示唆された。

(3) *tpoxN1* 遺伝子発現に関与する転写因子の単離および解析

tpoxN1 遺伝子の誘導に関与する転写因子の単離を目的とし、タバコの茎の傷害 30 分ならびに 2 時間後の発現ライブラリーを作成し、np62x4 配列をプローブとした yeast ワンハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、DNA 結合性の AP2/ERF タンパク質をコードする 2 種の新規 cDNA が単離され、これらを WRAF1 (wound-responsive AP2 like factor 1) および WRAF2 と命名した。2 種の WRAF-GST 融合タンパク質を作成し、これらを用いたゲルシフト解析の結果、両 WRAF タンパク質共に np62 領域に対する結合性を示し、*in vitro* での DNA 結合活性を有することが示された。np62 領域をさらに限定してゲルシフト解析を行ったところ、両タンパク質が結合する *tpoxN1* プロモーター上の cis 領域として新規 cis 領域 (-226～-216) の存在が示唆された。この新規 cis 配列は np5～np6 領域 (-546～-279) 内にも存在し、この領域内の 47 bp の領域 (-434～-388) に対しても 2 種の WRAF 共に結合活性を示した。両 WRAF 遺伝子の発現を解析した結果、傷害後 1 時間を最大に一過的に誘導されており、*tpoxN1* 遺伝子の傷害応答より迅速であった。タバコの茎を用いたボンバードメント法により両 WRAF タンパク質の転写活性を解析したところ、WRAF1 のみに転写活性が認められた。

(4) イモチ病菌誘導性のイネ *POX* 遺伝子の発現解析

イネ *POX* 遺伝子の病傷害応答の解析を目的に、22 種の *POX* 遺伝子を用いてイモチ病菌感染への応答を解析した。罹病性および抵抗性イネの第 8 葉期の葉を材料とし、イモチ病菌感染後の応答を解析した結果、22 種中、10 種の *POX* 遺伝子で応答が認められた。これらの遺伝子は、抵抗性イネでは感染初期に罹病性より強い発現応答が認められる一方、罹病性イネでの感染 5 日後に特に強い発現応答が認められる傾向が示された。また、イモチ病菌感染に対する発現パターンより 6 種類に分類された。22 種 *POX* 遺伝子のイモチ病菌感染に対する応答と、イネ染色体上での *POX* 遺伝子の局在性には関連が見られなかった。イモチ病菌感染により誘導されるイネ *POX* 遺伝子の器官特異的発現を解析したところ、根、鞘葉、穂において構成的発現の傾向が認められた。イモチ病菌感染応答性の 10 種 *POX* 遺伝子のプロベナゾール、ジャスモン酸ならびに傷害に対する応答を調べたところ、イモチ病菌感染により誘導される共通項を持ちながらも、その応答に多様性が認められた。*POX* 遺伝子はイモチ病菌感染に対する応答を含め、一つの刺激に対して複数の分子種が応答するといった、応答の重複性が示された。これらのことから、イネのイモチ病菌感染を含むストレス抵抗性に関する *POX* 活性の重要性が示唆された。

本研究では、タバコ植物について未知の傷害シグナル伝達により誘導される遺伝子の発現機構を解析し、そのプロモーター領域を特定した。この領域に結合する 2 種の新規な傷害誘導性転写因子を単離し、新規 cis 領域の存在を示した。また、イネイモチ病菌感染ならびにストレスに対する発現解析により、植物のストレス耐性における *POX* 機能の重要性が示唆された。これらの知見は学術的な知見に限らず、植物に病傷害ストレス耐性を

与える応用面に関しても大いに貢献するものと判断される。

よって審査員一同は、佐々木克友が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。